

## 生物素-DNA 探针标记效率检测试剂盒 (ECL 型)

Biotin-labeled DNA probe labeling efficiency Estimating kit (ECL substrate)

### 产品简介：

本试剂盒用于评估生物素标记的 DNA 的标记效率，所采用的方法是将标准品和待检测样品梯度点样到尼龙膜，探针结合的生物素与链霉亲和素-HRP 结合，通过 ECL 化学发光，底片曝光或者 ECL 化学发光成像仪记录灰度值，亦可以使用 DAB 或 AEC 沉淀型底物，根据灰度值的比对，估算出标记样品的标记效率，标记效率低于 30% 为标记不合格。

### 产品优势：

1. 本试剂盒操作简单，2 小时可以完成标记效率测算
2. 试剂盒备齐所需的试剂组分，不需要额外准备其他的材料。

### 产品组分：

尼龙膜 (8cm*12cm)	2 块
链霉亲和素-HRP (1000X)	20ul
ECL 化学发光底物 A	2.5ml
ECL 化学发光底物 B	2.5ml
Biotin-DNA Control (10nM)	200 $\mu$ l

### 储存条件：

链霉亲和素-HRP 和 Biotin-DNA Control(10nM)在-20°C 储存，其他组分 4°C 储存。

### 实验室需要具备条件：

- 紫外联仪 (254nm) 或超净工作台紫外灯，或手提式紫外检测仪 (灯)；
- 化学发光 CCD 或胶片曝光暗室。

注意：如果实验室没有化学发光 CCD 或胶片曝光暗室可以选择生物素 DNA 探针标记效率检测试剂盒 (DAB 型) 或生物素 DNA 探针标记效率检测试剂盒 (AEC 型)

### 其他需要自备试剂材料：

- 移液器及吸头
- PBS(pH 7.2)
- 去离子水

### 使用方法：

1. 将 10nM Biotin-DNA Control，用 TE 依次梯度稀释成 5nM、2.5nM、1nM、0.5nM 和 0.25nM 作为标准对照品；
2. 取 2-3ul 已经标记的生物素标记 DNA 探针，用 TE 稀释成 10nM 待检测。取出适量的 10nM 生物素标记的 DNA 探针，依次稀释成 5nM、2.5nM、1nM、0.5nM 和 0.25nM。
3. 将试剂盒内尼龙膜剪成合适大小，并做上标记，将以上步骤 1 和步骤 2 已经稀释好的标准对照品和待测的生物素标记的 DNA 探针依次点在膜上，每个点位点 2ul，可按下表的排列顺序点膜。

DNA 浓度	10nM	5nM	2.5nM	1.25nM	0.625nM	0.312nM
点膜体积	2ul	2ul	2ul	2ul	2ul	2ul
DNA 总量	20fmol	10fmol	5 fmol	2.5 fmol	1.25fmol	0.625fmol
<b>Biotin-DNA Control</b>	•	•	•	•	•	•
<b>待测 Biotin-DNA 探针</b>	•	•	•	•	•	•

- 按照上图点样后，充分自然晾干；
- 紫外交联仪或者紫外灯照射 10 分钟,距离不少于 10cm,如果没有紫外灯或者交联仪直接放在超净工作台。
- 放入 1% BSA-TBST 中封闭半小时；
- 加入链霉亲和素-HRP 工作液（使用前 1:1000 稀释），结合半小时；
- TBST 洗涤 3 次，每次 3 分钟；
- 取等体积 ECL A 组分和 ECL B 组分，混合后，滴加在膜上，立即胶片曝光或者化学发光成像仪记录图片。
- 如果实验室没有化学发光成像记录仪或者胶片曝光条件，可以选用 DAB 底物或者 AEC 底物显色后。

#### 结果判读与分析：

如果可以通过图像读取灰度数值，则可以建立 Biotin-DNA Control 的标准曲线，通过标准曲线计算待测 Biotin-DNA 探针浓度值，用计算得到的数值除以该点位 DNA 总量值，即可得到生物素标记效率；例如，通过标准曲线计算到待测 Biotin-DNA 探针第 2 个点的值为 7.5fmol，那么  $7.5/10=75\%$ ，即标记效率为 75%。

如果没有灰度分析仪，也可以通过肉眼观察比对估算标记效率，如：待测 Biotin-DNA 探针第 2 个点的灰度与 Biotin-DNA Control 的第 4 个点灰度值相似，则待测 Biotin-DNA 探针第 2 个点实际的生物素标记 DNA 探针为 2.5fmol，而待测 Biotin-DNA 探针第 2 个点的总 DNA 量为 10fmol,所以， $2.5/10=25\%$ ，通过肉眼估算得到结果比较粗糙。

#### 注意事项：

- 如果标记效率低于 30%，用于后续检测通常是不合格的。
- 由于 TdT 可以催化 DNA 3'端添加多个 Biotin-11-dUTP,所以有时候，很可能测算出来的标记效率数值大于 100%。

**\*本试剂仅供实验室研究使用**